

1768

**Extraktion, Charakterisierung  
und weitere Reinigung eines  
lipoidmobilisierenden Peptids  
(Fraktion H) aus Schweinehypophysen**

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
MEDICAL CENTER  
STANFORD, CALIF. 94305

**HANS-JÜRGEN THUNER**







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

AUS DER I.MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof.Dr. med. H. Schwiegk

Extraktion, Charakterisierung und weitere Reinigung  
eines lipidmobilisierenden Peptids (Fraktion H) aus  
Schweinehypophysen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Hans-Jürgen Thüner  
aus Lübbecke

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.M.Knedel

Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.Schwiegk

Dekan: Prof.Dr.F.Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 7. 1968

MEINEN ELTERN IN  
DANKBARKEIT



## INHALT

### A. Einleitung

### B. Methodik

#### I. Fraktionsgewinnung

1. Hypophysenaufbereitung
2. Chromatographie an Amberlite CG-50 II
  - a. Harzvorbereitung
  - b. Herstellen der Säule und Chromatographie

#### II. Aktivitätsprüfung

1. In vivo
2. In vitro

#### III. Identitätsvergleich mit Fraktion H

1. Chromatographie der Fraktion an DEAE-Cellulose
  - a. Vorbereitung der DEAE-Cellulose
  - b. Herstellen der Säule und Chromatographie
2. Physikalisch-chemisches Verhalten der Fraktion
  - a. Säure-Lauge-Stabilität
  - b. Pepsin-Trypsin-Spaltbarkeit
  - c. Trichloressigsäure-Löslichkeit
  - d. Dialysierbarkeit
  - e. Papierelektrophorese

#### IV. Gelfiltration an Sephadex

1. Vorversuche
  - a. Sephadex G-75
  - b. Sephadex G-25
  - c. Sephadex G-50
2. Gelfiltration an Sephadex G-50
  - a. Gel-Vorbereitung und Herstellen der Säule
  - b. Chromatographie

## C. Ergebnisse

### I. Fraktionsgewinnung

### II. Aktivitätsprüfung

### III. Identitätsvergleich mit Fraktion H

### IV. Gelfiltration an Sephadex

#### 1. Vorversuche

#### 2. Gelfiltration an Sephadex G-50

##### a. Chromatographie der Fraktion

##### b. Chromatographische Abgrenzung von ACTH

##### c. Chromatographie des Hypophysen-Extraktes

## D. Zusammenfassung und Diskussion

## A. Einleitung

Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß das Fettgewebe entgegen früheren Annahmen eine hohe Stoffwechselrate hat <sup>62</sup>. Die Fettmobilisation wird direkt von zahlreichen Hormonen beeinflusst, die sich in die zwei Gruppen, Katecholamine <sup>15,56,73,74,76</sup> und Peptidhormone <sup>15,48,71,76,77</sup> einteilen lassen. Den Schilddrüsenhormonen <sup>25,34</sup> und den Steroiden der Nebennierenrinde <sup>50</sup> kommt bei diesem Vorgang eine permissive Rolle zu. Die lipolytisch wirksamen Peptidhormone sind mit Ausnahme von Glucagon <sup>39,99</sup> alle hypophysären Ursprungs: Corticotropin (ACTH) <sup>43,48,56,73,74,92,93,101,102</sup>, Melanotropin (MSH) <sup>73,87</sup>, Thyreotropin (TSH) <sup>30,44,52,73</sup>, Somatotropin (STH) <sup>38,49,53,61,86,97,98</sup> und Arginin-Vasopressin <sup>73,94</sup> erhöhen speziesabhängig die freien Fettsäuren (FFA) in unterschiedlichem Ausmaß.

Seit nahezu 40 Jahren wird ein spezielles Fettstoffwechselhormon in der Hypophyse vermutet. Erstmals wird von ANSELMINO und HOFFMANN <sup>1,2,3,4</sup> über die fettmobilisierende Wirkung von Hypophysen-Gesamtextrakten berichtet. 1936 untersucht DINGEMANSE <sup>27</sup> die Wirkung des Hypophysenvorderlappens auf Ketonkörper. Zur gleichen Zeit zeigen BEST und CAMPBELL <sup>12</sup>, daß es nach Injektion von Hypophysengesamtextrakt zur Ausbildung einer Fettleber kommt; RAAB <sup>60</sup> schreibt eine Übersichtsarbeit über die Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch Hypophysenstoffe. In der Folgezeit weisen PAYNE <sup>58</sup>, CAMPBELL und LUCAS <sup>18</sup>, LEVIN und FABER <sup>51</sup>, STETTEN und SALCEDO <sup>85</sup>, NEUFELD et al. <sup>57</sup> und RUDMAN <sup>64,66</sup> die lipolytische Wirkung von Hypophysenextrakten nach. ROSENBERG <sup>63</sup> nimmt aufgrund seiner Untersuchungen mit oxycelgereinigtem ACTH an, daß bei der Isolierung gleich-

zeitig eine adipokinetische Substanz der Hypophyse mitisoliert wird.

1947 finden erstmals WEIL und STETTEN<sup>96</sup> einen lipä-mobilisierenden Faktor im Urin hungernder Säugetiere. Über diesen wird in der Folgezeit mehrfach berichtet, so von CHALMERS und Mitarbeitern<sup>17,20,21,22,23,24</sup>, GOTH und HEGEDÜS<sup>36</sup> und BEATON et al.<sup>9,10,11</sup>.

1956 beginnt mit der Arbeitsgruppe um SEIFTER<sup>80,81,82,103,104,105,106</sup> die Untersuchung von spezifisch lipolytisch wirkenden Hypophysenextrakten, über die weiterhin VINCENT et al.<sup>83,95</sup>, RYSZKA und KHOKHLOV<sup>78</sup>, TRYGSTAD<sup>88,89,90,91</sup> und BURNS et al.<sup>16</sup> berichten. Zwei Peptide, die von den bekannten Hypophysenhormonen als verschieden charakterisiert sind und stark lipolytisch wirken, isolieren LI et al.<sup>13,14,54,55</sup> bei der ACTH-Gewinnung aus Schafshypophysen. Zwei lipämobilisierende Peptide aus Schweinehypophysen, die Peptide I und II, isolieren und charakterisieren ASTWOOD und Mitarbeiter<sup>5,6,7,8,29,31,32,33,47</sup>. RUDMAN et al.<sup>41,42,65,67,68,69,70,71,72,75,76</sup> extrahieren mit der sogenannten Fraktion H ein lipämobilisierendes Polypeptid, das mit dem von ASTWOOD beschriebenen Peptid II identisch sein soll.

Ob dieser Fraktion H die Rolle eines selbständigen lipolytischen Hypophysen-Faktors, dessen Existenz die oben angeführten Untersuchungen sehr wahrscheinlich machen, zukommt, ist erst nach Reinderstellung, Strukturanalyse und Aufklärung des Wirkungsmechanismus zu sagen. Möglicherweise stellt die von RUDMAN beschriebene Fraktion eine Substanz dar, die eine physiologische Funktion in der Fettstoffwechsel-Regulierung hat. Wie kürzlich TRYGSTAD<sup>88,89,90,91</sup> und BURNS et al.<sup>16</sup> nachwiesen, ist auch beim Menschen ein entsprechendes Polypeptid zu finden.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, die fettmobilisierende Fraktion in Anlehnung an die Arbeiten RUDMAN<sup>67,68,69,72</sup> zu gewinnen, sie säulenchromatographisch gegenüber ACTH abzugrenzen und eine weitere chromatographische Reinigung unter Berücksichtigung neuerer Methoden zu versuchen.

## B. Methodik

### I. Fraktionsgewinnung

#### 1. Hypophysenaufbereitung

Frische Schweinehypophysen werden auf Trockeneis gesammelt und bei verzögerter Aufbereitung in einer Tiefkühltruhe gelagert. Nach Gefriertrocknung (Christ-Lyophilisator, Typ Delta) werden die Hypophysen in einem Porzellanmörser zerrieben. Mit 10 g dieses Pulverisates wird die Fraktionierung bei 0°C (Eis-Salz-Mischung) durchgeführt. Es werden zunächst 300 ml einer 2 %igen NaCl-Lösung zugegeben, das Gemisch mit 1 n NaOH auf pH 8,5 eingestellt und 4 Std. bei pH 8,5 und 0°C gerührt. Dann wird in der Kühlzentrifuge bei -5°C und 10 000 U/min (4 300 g) 15 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Präzipitates wird der rötliche Überstand mit 0,4 n HCl unter ständigem Rühren auf pH 4,5 eingestellt und erneut in der Kälte zentrifugiert. Der Niederschlag wird wieder verworfen und der Überstand mit dem doppelten Volumen Aceton versetzt. Das Gemisch wird 10 Minuten in der Kälte gerührt und anschließend zentrifugiert. Der jetzt hellrote Überstand wird erneut mit Aceton versetzt, bis ein 90 %iges Acetongemisch entsteht. Nach 10 Minuten Rühren und

15 Minuten Zentrifugieren in Kälte wird das Sediment in 80 ml destillierten Wassers gelöst und mit 0,4 n HCl auf pH 5,8 eingestellt. Diese Lösung wird 8 Stunden im Kühlschrank bei 4°C gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die weitere Trennung des Lyophilisates (Fraktion G) erfolgt säulenchromatographisch.

## 2. Chromatographie auf Amberlite CG-50 II (HRS et al. 40)

### a. Harzvorbereitung

Kationenaustauscher-Carboxylharz Amberlite, Type CG-50 II (Firma Rohm & Haas Company, Philadelphia, Pa., USA) wird auf eine einheitliche Korngröße von 200 - 400 mesh gebracht: 150 g Harz werden in 350 ml dest. Wasser 20 Minuten gerührt. Anschließend läßt man die Suspension 30 Minuten sedimentieren und verwirft die feinsten Teilchen mit dem Überstand. Dann werden 200 ml dest. Wasser zugesetzt, erneut 20 Minuten gerührt und nach 30 minütiger Sedimentationszeit dekantiert. Dieser Vorgang wird solange wiederholt (etwa 4 - 6 mal), bis der Überstand bereits nach einer Absetzzeit von 15 Minuten klar wird. Dann wird luftgetrocknet und anschließend mit Aceton gewaschen. Dazu wird das Harz mit 400 ml Aceton 3 Std. gerührt, durch eine Glasritze filtriert und solange mit Aceton nachgewaschen, bis das Filtrat klar wird. Nach erneuter Lufttrocknung werden die Acetonspuren unter Rühren durch Nachwaschen mit ca. 25 l dest. Wasser beseitigt.

Das Harz wird nun in die Salsform übergeführt: Es wird in 500 ml dest. Wasser suspendiert und durch schrittweises Zugabe von insgesamt 105 - 110 ml 40 %iger NaOH während 30 Minuten auf ein pH von 11 gebracht. Die dabei auftretende Wärme verschwindet während des anschließenden 3 stündigen Rührens. Das Na-Salz des

Harzes wird nun - wie oben angegeben - 5 mal mit 200 ml dest. Wasser versetzt, gerührt und nach Sedimentation dekantiert. Anschließend wird mit dest. Wasser gewaschen, bis ein pH von 10 erreicht ist. Zum Überführen in die H-Form wird das Harz mit 1000 ml 3 n HCl versetzt und 4 Std. gerührt. Die Säure wird abfiltriert, das Harz mit 6 l dest. Wasser gewaschen und anschließend mit 5 l 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, versetzt. Unter ständigem Rühren wird die Suspension langsam mit 40 %iger NaOH auf pH 5,8 gebracht und 12 Std. gerührt. Dann wird das Harz mit 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, äquilibriert.

Die Regeneration des Harzes erreicht man durch Überführen in die Säureform: Man erhitzt das Harz ca. 3 Std. mit 4 n HCl im Dampfbad und behandelt weiter, wie oben angegeben.

#### b. Herstellen der Säule und Chromatographie

Das vorbereitete Harz wird mit 3 Teilen 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, versetzt und mittels Magnetrührer in Suspension gehalten. Diese Suspension wird in eine Säule von 2,2 cm Durchmesser bis zu einer Höhe von 30 cm gepackt und 10 Std. mit 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 60 ml/Std. äquilibriert.

120 mg Fraktion G werden in 15 ml 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, gelöst und zentrifugiert; der Überstand wird auf die vorbereitete Säule aufgetragen und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 60 ml/Std. chromatographiert. Das Eluat wird in 5 ml-Fractionen gesammelt und die optische Dichte bei 278 mμ photometrisch bestimmt. Die dem Peak entsprechenden Röhrchen werden gepoolt und mit Ammoniumsulfat (42 g %)

gefällt. Nach Zentrifugieren wird das Präzipitat ind dest. Wasser gelöst, bei 4°C 8 Stunden gegen dest. Wasser dialysiert (Cellophan-Dislysierschlauch, Porengröße 25 - 80 Å, Durchlässigkeitsgrenze bei einem Molekulargewicht von 5 000) und anschließend lyophilisiert.

## II. Aktivitätsprüfung

Die so erhaltene Fraktion wird in vivo an Kaninchen und in vitro am Fettgewebe von Kaninchen, Ratten und Menschen auf ihre lipolytische Aktivität geprüft. Als Parameter der Lipolyse werden nach DOLE<sup>28</sup> die freien Fettsäuren (FFA) bestimmt mit Nilblau A als Indikator<sup>35</sup>.

### 1. In vivo-Bestimmung

Je 4 Kaninchen, die alle mit Altrumin-Pellets ad libitum gefüttert waren, werden 0,6 mg, 1,2 mg und 2,4 mg lipolytische Fraktion (jeweils in 2,0 ml 0,9 %ige NaCl gelöst) subcutan interscapulär injiziert. 6 Kontrolltiere erhalten 2,0 ml 0,9 %ige NaCl. Unmittelbar vor und 1 Std. nach Injektion wird den Kaninchen Blut aus einer Ohrrendvene entnommen; die freien Fettsäuren werden in mval/l Serum angegeben.

### 2. In vitro-Bestimmung

Die Untersuchungen wurden im Prinzip nach den Angaben von SCHWANDT et al.<sup>79</sup> durchgeführt.

Substrat: Perirenales Fettgewebe von Kaninchen, epididymales Fettgewebe von Meerschweinchen und Ratten, subcutanes und mesenteriales Fettgewebe vom Menschen.

**Puffer:** Krebs-Ringer-Bicarbonat in folgender Zusammensetzung:

|                               |       |           |
|-------------------------------|-------|-----------|
| 100 ml NaCl                   | 0,9 % | (0,154 m) |
| 4 ml KCl                      | 0,15% | (0,154 m) |
| 3 ml $\text{CaCl}_2$          |       | (0,11 m)  |
| 1 ml $\text{MgSO}_4$          | 3,84% | (0,154 m) |
| 1 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 2,11% | (0,154 m) |
| 21 ml $\text{NaHCO}_3$        | 1,3 % | (0,154 m) |

pH 7,4; 5 g % Rinder-Albumin (Behringwerke, Marburg), fettsäurefrei gewaschen.

Albuminwaschung (CAMPBELL<sup>19</sup>): 10 g trockenes Albuminpulver werden 15 Minuten bei 0°C mit 100 ml Äthanol-Diäthyläther (v/v = 3/1) gerührt, filtriert, mit wasserfreiem Diäthyläther mehrfach nachgewaschen und im Vakuum bei 37°C getrocknet.

**Zugesetzte Mengen von lipolytischer Fraktion:**

0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,6 µg, 1,0 µg und 5,0 µg/ml Inkubationsmedium (Kaninchenfettgewebe);

3,3 µg, 16,7 µg, 33,3 µg, 70 µg und 170 µg/ml Inkubationsmedium (Meerschweinchen- und Rattenfettgewebe);

30 µg  
0,03 µg, 0,3 µg, 3,0 µg, 100 µg und 350 µg/ml Inkubationsmedium (Fettgewebe vom Menschen).

**Inkubationsbedingungen:** Warburg-Apparatur (Firma Braun, Melsungen)

mit einer Schüttelfrequenz von 80/min und Schüttelamplitude von 2,5 cm; Carbogen-Atmosphäre (95 %  $\text{O}_2$  + 5 %  $\text{CO}_2$ ); 37°C; 3 Stunden.

Abgewogene Fettgewebsportionen werden in 3 ml albuminhaltigem Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit den oben genannten Konzentrationen der lipolytischen Fraktionen unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Im Anschluß werden die FFA im Inkubationsmedium nach DOLE<sup>28</sup> bestimmt; die Ergebnisse werden in mval/l/g/3 Std. angegeben.

### III. Identitätsvergleich mit Fraktion H

Die lipolytische Fraktion wird nach den Kriterien von RUDMAN<sup>69</sup> auf die Identität mit der von ihm isolierten Fraktion H geprüft.

#### 1. Chromatographie der Fraktion an DEAE-Cellulose

Die lipolytische Substanz wird nach bekannten Verfahren<sup>45,46,59,84</sup> unter Berücksichtigung der RUDMANschen Modifikation<sup>69</sup> mit diskontinuierlicher Gradientenelutionschromatographie an DEAE-Cellulose weiter aufgetrennt.

#### a. Vorbereitung der DEAE-Cellulose

Aus 25 g Diaminoethyl (=DEAE)-Cellulose (Firma Serva, Heidelberg) mit einer Kapazität von 0,54 mval/g wird mit dest. Wasser eine 2 %ige Suspension hergestellt. Nach 2 minütigem Stehen wird das Sediment und nach weiteren 45 Minuten Absetzzeit der Überstand verworfen, um im Sediment eine weitgehend einheitliche Korngröße zu erhalten. Durch Waschen mit Grenzpuffer (0,3 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,6) wird die Cellulose "vorgealtert". Nach Behandlung mit 0,1 N NaOH, bzw. 0,1 N HCl wird die Cellulose jeweils mit dest. Wasser gewaschen, bis ein neutrales pH erreicht ist und schließ-

lich mit dem Startpuffer äquilibriert.

#### b. Herstellen der Säule und Chromatographie

Mit 0,01 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,4 (Startpuffer), wird die DEAE-Cellulose in eine 4 %ige Suspension gebracht. Beim Gießen der 1 x 30 cm Säule wird die Durchflußgeschwindigkeit mittels Preßluft-Druckflasche unter allmählich ansteigendem Druck bis  $0,5 \text{ kg/cm}^2$  konstant auf 20 ml/Std. gehalten. Anschließend wird mit dem Startpuffer bei einer Durchflußrate von 25 ml/Std. äquilibriert.

Die vorbereitete Säule wird mit 13,2 mg Fraktion, die in 20 ml Startpuffer gelöst sind, beschickt. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 25 ml/Std. wird mit folgenden Gradienten diskontinuierlich eluiert:

- A. 65 ml 0,01 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,4,
- B. 90 ml 0,05 m " " " , pH 5,4,
- C. 90 ml 0,15 m " " " , pH 5,5,
- D. 100 ml 0,30 m " " " , pH 5,6,
- E. 1,00 n HCl zum Nachwaschen.

Das Eluat wird in 5 ml-Fractionen gesammelt und wie unter I.2.b. angegeben weiterbehandelt. Die Aktivität der den einzelnen Peaks entsprechenden Substanzen wird in vivo an Kaninchen getestet.

## 2. Physikalisch-chemisches Verhalten der Fraktion

#### a. Säure-Lauge-Stabilität

Je 3 mg Fraktion werden mit 6 ml 0,1 n HCl 30 Minuten, bzw. mit 6 ml 0,1 n NaOH 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Lösungen werden neutralisiert und an Kaninchen durch subcutane Injektion von je

1 ml (entsprechend 0,5 mg Fraktion) auf ihre lipolytische Aktivität untersucht.

#### b. Pepsin-Trypsin-Spaltbarkeit

1 mg kristallines Pepsin (Firma Merck, Darmstadt) wird in 20 ml 0,01 n HCl gelöst. 0,5 ml dieser Lösung (entsprechend 0,025 mg Pepsin) werden mit 0,01 n HCl auf 4 ml aufgefüllt, mit 1 mg Fraktion versetzt und 90 Minuten im Wasserbad bei 25°C inkubiert. Ebenso wird die Fraktion mit Trypsin (Firma Merck, Darmstadt) behandelt (1 Teil Trypsin auf 40 Teile Fraktion), wobei mit 0,1 n NaOH das pH auf 9 eingestellt wird. Nach Inkubation werden beide Ansätze neutralisiert und je 2 ml (entsprechend 0,5 mg Fraktion) Kaninchen zur Testung auf Aktivität injiziert.

#### c. Trichloressigsäure-Löslichkeit

3 mg Fraktion werden mit 10 ml 5 %ige Trichloressigsäure (TCA) versetzt und nach 10 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wird in 6 ml dest. Wasser gelöst. Davon wird 1 ml (entsprechend 0,5 mg Fraktion) Kaninchen zur Prüfung der lipolytischen Aktivität subcutan injiziert.

Der TCA-Überstand wird 4 x mit dem gleichen Volumen Diäthyläther extrahiert. Dann werden 1,6 ml des Überstandes (entsprechend 0,5 mg Fraktion) Kaninchen injiziert.

#### d. Dialysierbarkeit

Die in dest. Wasser gelöste Fraktion wird 8 Stunden bei 4°C gegen dest. Wasser dialysiert (Cellophan-Dialysiereschlauch, Porengröße 25 - 80 Å, Durchlässigkeitsgrenze bei einem Molekulargewicht von 5 000).

#### e. Papierelektrophorese

Es wird papierelektrophoretisch nach dem Verfahren von GRASSMANN und HANNIG <sup>37</sup> das Verhalten der Amberlite CG-50 II - und der DEAE-Cellulose - Fraktion geprüft und die Wanderungsgeschwindigkeit beider mit der von Normalserum verglichen. Als Puffer wird dabei MICHAELIS-Veronal-Natriumacetat-Puffer pH 8,6, Ionenstärke 0,1  $\mu$ ) verwandt. Aufgetragen wird auf Whatman Nr. 1 - Papier bei einer Trennlänge von 13 cm. Die Trennzeit beträgt 14 Stunden, die Spannung 120 Volt.

#### IV. Gelfiltration an Sephadex

Abgesehen von sorgfältiger Beachtung der Vorschriften bei Vorbereitung des Gels, Herstellen der Gelpackung und Beschicken der Säule, die später erörtert werden (IV.2.a.), sind die Bedingungen für optimale Ergebnisse bei Gelfiltration an Sephadex (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) im wesentlichen gegeben durch die Auswahl des geeigneten Gel-Typs, durch das Säulenvolumen, die Durchflußgeschwindigkeit und die Menge, bzw. das Volumen der Probe.

##### 1. Vorversuche

In Tab. 1 sind die verschiedenen Trennversuche mit den jeweils geänderten Bedingungen zusammengefaßt.

##### a. Sephadex G-75

Mit diesem Gel wurden 3 Versuche durchgeführt (Tab.1). Sephadex G-75, das in der Siebfraktion "fein" (Perlgroße 20-80  $\mu$ ) verwendet wurde, hat einen Fraktionierbereich, der bei Molgewichten zwischen 1 000 und 50 000 liegt, bzw. eine Ausschußgrenze bei Molgewicht 50 000..

## b. Sephadex G-25

An Sephadex G-25, Siebfraktion "fein", Fraktionierbereich 100 bis 5 000 (Molgewicht), wurden 2 orientierende Versuche durchgeführt (Tab.1).

## c. Sephadex G-50

Die Versuchsbedingungen der Gelfiltration mit Sephadex G-50, Siebfraktion "fein", Fraktionierbereich 500 bis 10 000 (Molgewicht) wurden 7 mal variiert (Tab.1.), ehe die qualitativ und quantitativ günstigsten Bedingungen gefunden waren.

## 2. Gelfiltration an Sephadex G-50 (DETERMANN<sup>26</sup>)

### a. Gel-Vorbereitung und Herstellen der Säule

60 g Sephadex G-50 werden mit 1000 ml dest. Wasser versetzt, ca. 5 Std. gequollen und mit 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, äquilibriert. Zum Gießen der 2,6 x 95 cm Säule (Chromatographierrohr, Typ K 25/100, jacketed; Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) wird das so vorbereitete Gel im doppelten Volumen 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, suspendiert. Diese Gel-Suspension wird in einen Erlenmeyerkolben mit einem Ausflußstutzen über dem Boden gefüllt und mit einem Magnetrührer homogen gehalten. Ausflußstutzen und angestrebte Säulenfüllhöhe befinden sich auf gleichem Niveau, wobei die Säule für eine gleichmäßige Packung lotrecht montiert sein muß. Bei verschlossenem Säulenausfluß wird über ein Schlauchsystem die Gelsuspension bis zur gewünschten Höhe (95 cm) in die Säule gefüllt. Nachdem sich über der Säulenfritte einige Zentimetergepackten Gels gebildet haben, wird die weitere Gelpackung durch zunehmendes Öffnen des Säulenausflusses erreicht, da in dem

Maße über das geschlossene Schlauchsystem Gel aus dem Vorratgefäß nachläuft, wie Puffer aus der Kapillare tropft. Nachdem die Gelpackung die vorgesehene Höhe erreicht hat, wird die Säule 12 Stunden mit 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, Äquilibriert. Eine konstante Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/Std. wird durch Zwischenschalten einer Schlauchdosierpumpe am Säulenausfluß erreicht. Auf die waagerechte Gel-Oberfläche wird ein genau eingepaßtes Filtrierpapier gelegt, um das Aufwirbeln des Gels beim Auftropfen des Probevolumens zu vermeiden.

#### b. Chromatographie

Jeweils in 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, gelöst werden

- A. 30 mg Fraktion in 3,5 ml;
- B. 450 IE ( $\approx$ 39 mg) ACTH (Firma Schering, Berlin) in 3,5 ml;
- C. 30 mg Fraktion + 450 IE ACTH in 6,0 ml und
- D. 125 mg Hypophysenextrakt (Fraktion G) in 10 ml Puffer

nacheinander auf derselben Säule bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/Std. fraktioniert. Zum Beschicken der Säule wird der über der Oberfläche der Säulenfüllung stehende Puffer abgesaugt. Sobald der Rest des Überstandes gerade eingesickert ist, wird die Probelösung vorsichtig aufgetropft und anschließend der gleiche Vorgang mit einem entsprechenden Volumen des Eluens, 0,2 m Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, wiederholt. Absorptionmessung und Weiterbehandlung des in 5 ml-Fractionen gesammelten Eluats erfolgen nach den unter I.2.b. angegebenen Bedingungen. Zur in vivo-Aktivitätsprüfung an Kaninchen werden die gepoolten Eluate der jeweiligen Peaks verwendet.

## C. Ergebnisse

### I. Fraktionsgewinnung

Die Abb. 1 zeigt das Chromatogramm des Hypophysenextraktes (Fraktion G) auf der Amberlite CG-50 II - Säule mit dem Extinktionsmaximum in den Sammelfraktionen 11-21. Diesem entsprechen 23,6 mg wirksamer Fraktion bei einer Auftragsmenge von 120 mg Fraktion G ( $\pm$  3,8 g lyophilisierter Hypophysen). Somit ergibt sich eine Ausbeute an lipolytisch wirksamer Substanz von 6,2 mg/g gefriergetrocknete Hypophysen.

### II. Aktivitätsprüfung

Die in vivo-Wirksamkeit der Fraktion ist im Vergleich zu Injektionen von physiologischer NaCl in Tab. 2 wiedergegeben. Alle getesteten Mengen an lipolytisch wirksamer Substanz zeigten einen signifikanten FFA-Anstieg (t-Test:  $P < 0,0005$ ;  $n = 4$ ) bei Kaninchen im Vergleich zu den Ausgangswerten und den Kontrolltieren, die NaCl erhielten.

In Abb. 2 ist das genaue zeitliche Verhalten der freien Fettsäuren gezeigt: 15 Minuten nach subcutaner Injektion von 3 mg Fraktion sind die FFA auf das Doppelte des Ausgangswertes gestiegen; nach 1 Std. erreichen sie den Maximalwert, der nach einer weiteren Stunde langsam abzufallen beginnt. 10 Std. nach Injektion sind die FFA immer noch auf mehr als das Vielfache des Ausgangswertes erhöht.

Die in vitro-Aktivität der Fraktion an perirenalem Kaninchenfettgewebe ist in Abb. 3 veranschaulicht; die steigende Dosierung bewirkt zunehmende Lipolyse (halblogarithmische Darstellung).

Orientierende Untersuchungen mit Dosen von 3,3 µg bis 170 µg Fraktion/ml Inkubationsmedium an epididymalem Fettgewebe von Meerschweinchen und Ratten, bzw. von 0,03 µg bis 350 µg Fraktion/ml Inkubationsmedium an subcutanem und mesenterialem Fettgewebe vom Menschen ergaben (Tab. 3), daß die minimal wirksame Dosis beim Meerschweinchen 70 µg/ml beträgt. Am Fettgewebe von Ratten und Mensch ließ sich auch mit höchsten Dosen kein signifikanter lipolytischer Effekt der Fraktion nachweisen.

### III. Identitätsvergleich mit Fraktion H

#### Das DEAE-Cellulose-Chromatogramm der Fraktion

ist in Abb. 4 dargestellt. Die den einzelnen Peaks entsprechenden Fraktionen wurden in vivo an Kaninchen auf ihre lipolytische Aktivität untersucht, wobei sich nur die gepoolten Sammelfraktionen 39 - 51 als wirksam erwiesen: 0,5 mg bewirkten einen FFA-Anstieg von 0,312 mval/l auf 2,184 mval/l (1 Std. nach Injektion).

Das physikalisch-chemische Verhalten der Fraktion, das nach verschiedenen Kriterien geprüft wurde, entsprach den RUDMANschen Ergebnissen<sup>68</sup> (Tab. 4):

Die mit 0,1 n NaOH und Trypsin behandelte Fraktion zeigt keine lipolytische Wirkung mehr; auch der TCA-Überstand ist unwirksam. - In der Papierelektrophorese (Abb. 5) weist die Fraktion 3 Banden auf und das 0,8-fache der Wanderungsgeschwindigkeit von Serumalbumin. Die weiter gereinigte DEAE-Cellulose-Fraktion ergibt eine Bande.

#### IV. Gelfiltration an Sephadex

##### 1. Vorversuche

Während die Chromatogramme auf Sephadex G-25 nur einen Peak ergeben, war auf Sephadex G-75 die Auftrennung der Fraktion G in 2 Peaks möglich.

Erst mit Sephadex G-50 konnte eine bessere Trennung erreicht werden, die sich durch Änderung von Säulenabmessung, Durchflußrate und Auftragsmenge noch weiter verbessern ließ: Gelpackung von 2,6 x 95 cm, Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/Std. und Begrenzung von Auftragsmenge und -volumen auf maximal 120 mg bzw. 10 ml stellen die optimalen Bedingungen dar.

##### 2. Gelfiltration an Sephadex G-50

###### a. Chromatographie der Fraktion.

Das Chromatogramm der lipolytischen Fraktion (Abb. 6) zeigt im Bereich der Sammelfraktionen 49-56 einen symmetrischen Peak. Zur Aktivitätsprüfung werden nur die mit Sicherheit nicht durch andere Substanzen verunreinigten Röhrchen 50-56 verwandt. In diesen können sich entsprechend der Auftragsmenge nur maximal 30 mg Fraktion befinden, wahrscheinlich jedoch weniger, da die verworfenen Proben auch noch kleine Mengen an Fraktion enthalten. Wie aus den ersten 4 Spalten der Tab. 5 ersichtlich, hatte das Eluat des Fraktionspeaks größere Aktivität als vergleichsweise Mengen der Fraktion.

###### b. Chromatographische Abgrenzung von ACTH

Das in Abb. 7 dargestellte Chromatogramm von 450 IE ACTH auf Sephadex G-50 ergab im Bereich der Sammelfrak-

tionen 59-67 einen symmetrischen Peak mit dem Maximum in Fraktion 63. 0,3 ml der gepoolten Eluate 61-66 bewirkten nach subcutaner Injektion bei Kaninchen keinen Anstieg der FFA; mit 3 ml war jedoch eine deutliche Lipolyse zu erzielen (Tab. 5).

Abb. 8 zeigt die chromatographische Auftrennung von einem Gemisch aus Fraktion und ACTH. Aus dem Vergleich der Abb. 6, 7 und 8 ergibt sich, daß die lipolytische Fraktion vor ACTH erscheint; zwischen den Gipfeln der beiden symmetrischen, gut abgrenzbaren Peaks liegen 12 Röhrchen mit jeweils 5 ml Eluat. Im Chromatogramm der Abb. 8 erscheint der der Fraktion zugehörige Peak mit dem Maximum bei Röhrchen 51 an genau gleicher Stelle wie in Abb. 6; der ACTH-Peak in Abb. 8 bei Röhrchen 63 an mit Abb. 7 identischer Stelle. Die Form beider Peaks gleicht der in beiden Einzelchromatogrammen.

#### c. Chromatographie des Hypophysenextraktes

Abb. 9 zeigt das Chromatogramm von Fraktion G auf der Sephadex G-50-Säule. In den Sammelfractionen 39-56 bzw. 61-68 finden sich zwei durch 4 Sammelfractionen voneinander getrennte Peaks, von denen nur der zweite einheitlich ist (Maximum bei Röhrchen 63). Da der erste Peak sich an Sephadex G-50 nicht eindeutig in weitere Fraktionen auftrennen ließ, wurden die gepoolten Eluate 39-56 nach Ammoniumsulfatfällung, Dialysieren und Lyophilisieren auf ihre lipolytische Aktivität getestet. Die Ausbeute der Fraktionen 39-56 betrug 4,4 mg aktive Substanz/g lyophilisierte Hypophysen. - Die Extinktionsmaxima des Hypophysenextraktes (Fraktion G) und der nach Amberlite-Chromatographie gewonnenen lipolytischen Fraktion (Fraktion H) waren bei Röhrchen 51 an identischer Stelle.

In Tab. 6 ist die lipolytische Wirkung von verschiedenen Injektionsmengen der Amberlite- und Sephadex-Fraktionen verglichen. Dabei zeigt sich, daß die auf Sephadex G-50 chromatographierte Fraktion einen stärkeren lipidmobilisierenden Effekt hat. Die Ausbeute an dieser Fraktion ist mit 4,4 mg gegenüber 0,2 mg/g lyophilisierte Hypophysen geringer.

#### D. Zusammenfassung und Diskussion

Aus Schweinehypophysen wurde eine lipidmobilisierende Substanz dargestellt, die bei gleicher Ausbeute und Aktivität ein mit der von RUDMAN et al. extrahierten Fraktion H identisches physikalisch-chemisches Verhalten zeigt: Chromatographie auf Amberlite CG-50 II und DEAE-Cellulose, Resistenz gegenüber Säure und Lauge, Spaltbarkeit durch Pepsin und Trypsin, Löslichkeit in Trichloressigsäure, Dialyseverhalten, Papier-elektrophorese. Während bei Kaninchen - und in schwächerem Maße auch bei Meerschweinchen - eine starke Lipolysewirkung nachweisbar war, fehlte der lipidmobilisierende Effekt am Fettgewebe von Ratte und Mensch.

Wenn auch eine Kontamination mit ACTH als lipolytische Substanz aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens dieses Peptidhormones - ACTH ist dialysierbar, in wässriger alkalischer Lösung nur unvollständig extrahierbar und mit Aceton in niedriger Konzentration fällbar - weitgehend ausgeschlossen werden kann, konnte auf Sephadex G-50 eine säulenchromatographische Abtrennung der lipolytischen Fraktion von aus Schweinehypophysen gewonnenem ACTH durchgeführt werden. Auch andere bekannte lipidmobilisierende Hypophysenhormone sind nach den Untersuchungen von RUDMAN et al. <sup>68,69</sup> nur in lipolytisch unwirksamen Konzentrationen in der Fraktion H vorhanden.

Nachdem sich bei den chromatographischen Untersuchungen von Fraktion H an Sephadex ergeben hatte, daß durch dieses Verfahren eine weitere Reinigung von Begleitstoffen möglich schien, wurde der Hypophysenextrakt direkt auf Sephadex G-50 chromatographiert. Dabei ergab sich eine Zunahme der lipolytischen Aktivität pro Gewichtseinheit bei geringerer Ausbeute pro g lyophilisierte Hypophysen. Der nicht einheitliche Extinktionspeak deutet auf Begleitsubstanzen hin.

Nach WHITAKER<sup>100</sup> ist die Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration mit annähernder Genauigkeit möglich. Aufgrund der vorliegenden Befunde kann das ungefähre Molekulargewicht der Fraktion jedoch nur geschätzt werden: Da natürliches ACTH mit einem Molekulargewicht von 4 500 später erscheint als die Fraktion H, könnte bei dem Fraktionierbereich von Sephadex G-50 zwischen 500 und 10 000 (Molgewicht) das Molekulargewicht der lipolytischen Substanz zwischen 4 500 und 10 000 liegen. Kleinere Moleküle als ACTH müßten später eluiert werden, da bei Gelfiltration mit Sephadex in der Reihenfolge der abnehmenden Molekülgröße eluiert wird; andererseits liegt die Ausschlußgrenze des verwendeten Gels bei Molgewicht 10 000.

Tab.1: Vorversuche zur Gelfiltration an Sephadex

| Sephadex-<br>Typ | Säulen-<br>Volumen | Durchflußge-<br>schwindigkeit | Probe-<br>Volumen | Menge der<br>Probe |
|------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| G-75             | 2,2 x 30 cm        | 50 ml/Std                     | 16,0 ml           | 140 mg             |
| G-75             | 1,6 x 88 cm        | 23 ml/Std                     | 15,0 ml           | 120 mg             |
| G-75             | 1,6 x 88 cm        | 15 ml/Std                     | 10,0 ml           | 120 mg             |
| G-25             | 2,2 x 33 cm        | 20 ml/Std                     | 7,0 ml            | 50 mg              |
| G-25             | 1,6 x 93 cm        | 15 ml/Std                     | 5,5 ml            | 70 mg              |
| G-50             | 2,2 x 30 cm        | 80 ml/Std                     | 15,0 ml           | 120 mg             |
| G-50             | 1,6 x 75 cm        | 36 ml/Std                     | 15,0 ml           | 120 mg             |
| G-50             | 2,6 x 93 cm        | 15 ml/Std                     | 10,0 ml           | 128 mg             |
| G-50             | 2,2 x 30 cm        | 15 ml/Std                     | 5,5 ml            | 70 mg              |
| G-50             | 2,0 x 195 cm       | 15 ml/Std                     | 10,0 ml           | 125 mg             |
| G-50             | 2,6 x 96 cm        | 15 ml/Std                     | 5,5 ml            | 119 mg             |
| G-50             | 2,6 x 96 cm        | 11 ml/Std                     | 10,0 ml           | 137 mg             |

Tab.2: In vivo-Lipolyse bei Kaninchen

| Injizierte Substanz | FFA in mval/l vor Injektion | FFA in mval/l nach Injektion | Differenz in mval/l |
|---------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|
| 0,6 mg Fraktion     | 0,497 ± 0,214               | 2,156 ± 0,763                | + 1,659             |
| 1,2 mg Fraktion     | 0,501 ± 0,186               | 2,293 ± 0,612                | + 1,792             |
| 2,4 mg Fraktion     | 0,453 ± 0,064               | 3,250 ± 0,801                | + 2,797             |
| 2,0 ml NaCl 0,9 %   | 0,443 ± 0,100               | 0,467 ± 0,083                | + 0,024             |

Tab.3: In vitro-Lipolyse bei Meerschweinchen, Ratten und Mensch

| Inkubiertes Fettgewebe | Dosis in µg/ml | FFA in mval/l/g/3 Std | Signifikanz  | n |
|------------------------|----------------|-----------------------|--------------|---|
| Meerschweinchen        | 0              | 1,450 ± 0,209         | ) P < 0,0005 | 8 |
| Meerschweinchen        | 70             | 3,332 ± 0,589         |              |   |
| Ratte                  | 0              | 3,564 ± 0,545         | ) P < 0,1    | 4 |
| Ratte                  | 170            | 4,739 ± 1,289         |              |   |
| Mensch                 | 0              | 0,876 ± 0,059         | ) P < 0,1    | 3 |
| Mensch                 | 350            | 0,943 ± 0,046         |              |   |

Tab.4: In vivo-Wirkung der Fraktion nach Säure-Alkali-Erhitzung, nach Pepsin-Trypsin-Spaltung und nach Trichloressigsäure-Lösung

| Injizierte Substanz             | FPA in mval/l vor Injektion | FPA in mval/l nach Injektion | Differenz in mval/l |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|
| 0,5 mg Fraktion (nach Säure)    | 0,342                       | 2,985                        | + 2,643             |
| 0,5 mg Fraktion (nach Alkali)   | 0,375                       | 0,417                        | + 0,042             |
| 0,5 mg Fraktion (nach Pepsin)   | 0,552                       | 4,095                        | + 3,543             |
| 0,5 mg Fraktion (nach Trypsin)  | 0,453                       | 0,450                        | - 0,003             |
| 0,5 mg Fraktion (TCA-Sediment)  | 0,312                       | 2,325                        | + 2,013             |
| 0,5 mg Fraktion (TCA-Überstand) | 0,390                       | 0,384                        | - 0,006             |

Tab.5: In vivo-Wirkung von Fraktion und ACTH bei Kaninchen

| Injizierte<br>Substanz                                       | FFA in mval/L<br>vor Injektion | FFA in mval/l<br>nach Injektion | Differenz<br>in mval/l |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 1,5 ml Eluat des Frak-<br>tionspeaks ( $\cong < 1,3$ mg Fr.) | 0,882                          | 3,679                           | + 2,797                |
| 1,2 mg Fraktion                                              | 0,501                          | 2,258                           | + 1,757                |
| 3,0 ml Eluat des Frak-<br>tionspeaks ( $\cong < 2,6$ mg Fr.) | 0,800                          | 4,240                           | + 3,440                |
| 2,4 mg Fraktion                                              | 0,453                          | 3,418                           | + 2,965                |
| 0,3 ml Eluat des ACTH-<br>Peaks ( $\cong < 4,5$ IE ACTH)     | 0,551                          | 0,495                           | - 0,056                |
| 3,0 ml Eluat des ACTH-<br>Peaks ( $\cong < 45,0$ IE ACTH)    | 0,463                          | 3,686                           | + 3,223                |

Tab.6: Vergleich der in vivo-Aktivität von Amberlite- und Sephadex-Fraktion an Kaninchen

| Injizierte Substanz           | FFA in mval/l vor Injektion | FFA in mval/l nach Injektion | Differenz in mval/l | n |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|---|
| 62,5 µg Fraktion (Amberlite)  | 0,450 ± 0,082               | 0,707 ± 0,168                | + 0,257             | 3 |
| 62,5 µg Fraktion (Sephadex)   | 0,543 ± 0,107               | 1,197 ± 0,359                | + 0,654             | 4 |
| 125,0 µg Fraktion (Amberlite) | 0,440 ± 0,044               | 0,769 ± 0,126                | + 0,329             | 3 |
| 125,0 µg Fraktion (Sephadex)  | 0,472 ± 0,205               | 2,816 ± 0,498                | + 2,344             | 4 |
| 250,0 µg Fraktion (Amberlite) | 0,499 ± 0,122               | 0,956 ± 0,080                | + 0,457             | 3 |
| 250,0 µg Fraktion (Sephadex)  | 0,532 ± 0,255               | 3,070 ± 0,542                | + 2,538             | 4 |

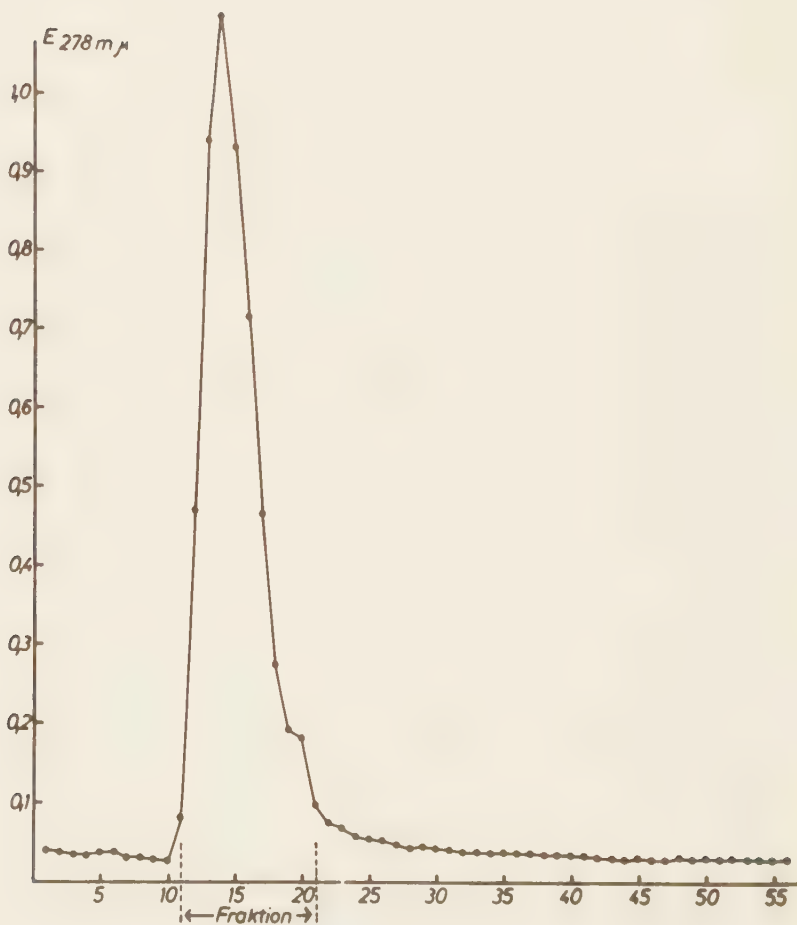


Abb.1: Chromatographie von 120 mg Hypophysenextrakt auf Amberlite CG-50 II - Säule (2,2 x 30 cm)  
Durchflußgeschwindigkeit 60 ml/Std  
0,2 m Natriumphosphatpuffer,  $p_H$  5,8

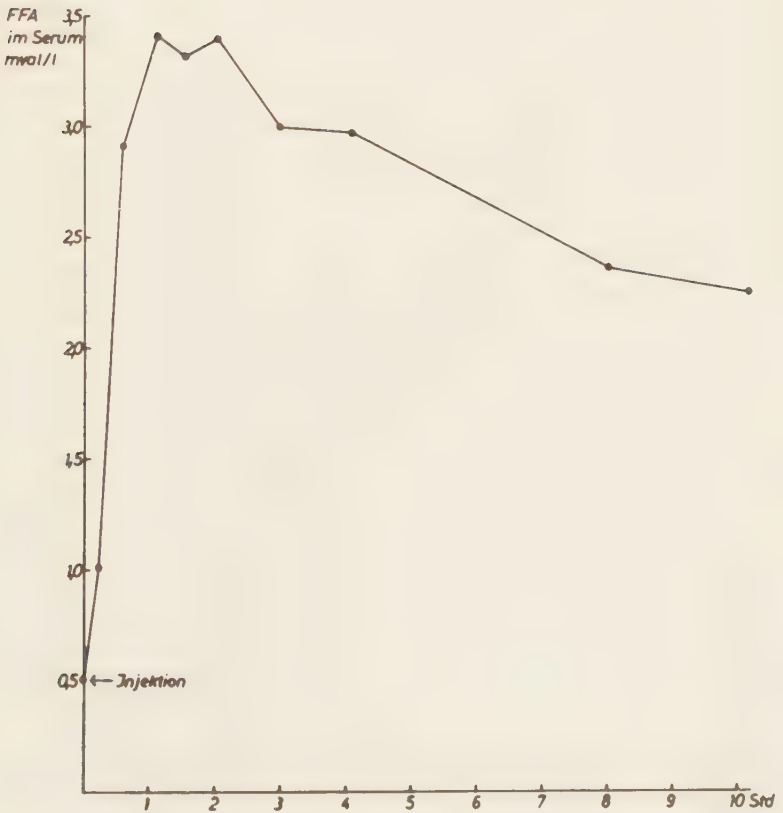


Abb.2: Zeitliches Verhalten der freien Fettsäuren im Kaninchen-Serum nach Injektion von 3 mg Fraktion

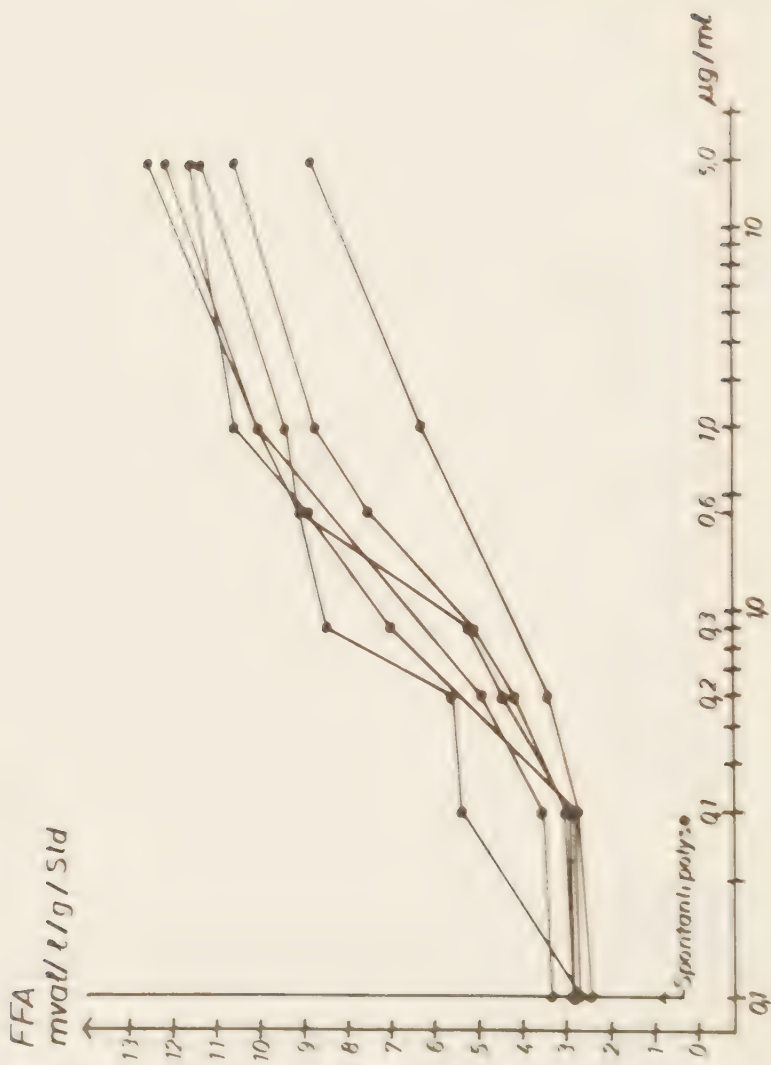


Abb. 3: In vitro-Koeffizient der Fraktion an peripheren Kaninchen-Gelelebe

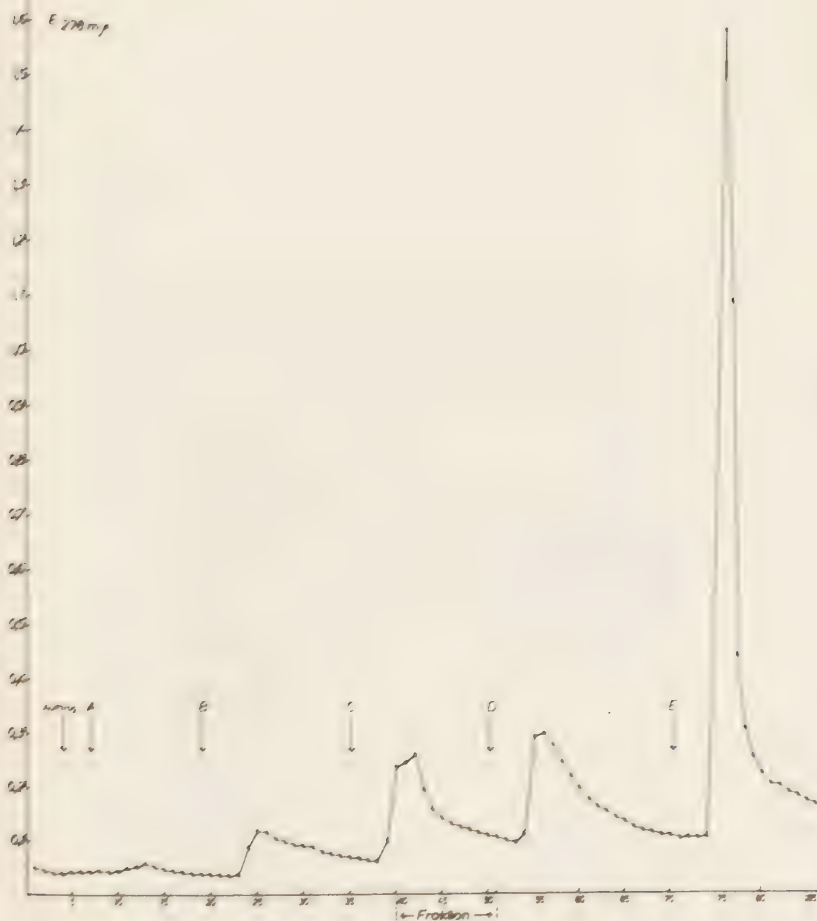


Abb. 4: Chromatographie von 13,2 mg Fraktion  
auf DEAE-Cellulose - Säule (1 x 30 cm)  
Durchflußgeschwindigkeit 25 ml/std  
Die mit A - E markierten Auftragsstellen ent-  
sprechen folgenden Natriumpyruvatkonzentrationen:

- A 0,01 m, pH 5,4
- B 0,05 m, pH 5,4
- C 0,15 m, pH 5,5
- D 0,30 m, pH 5,6
- E 1,0 m HCl

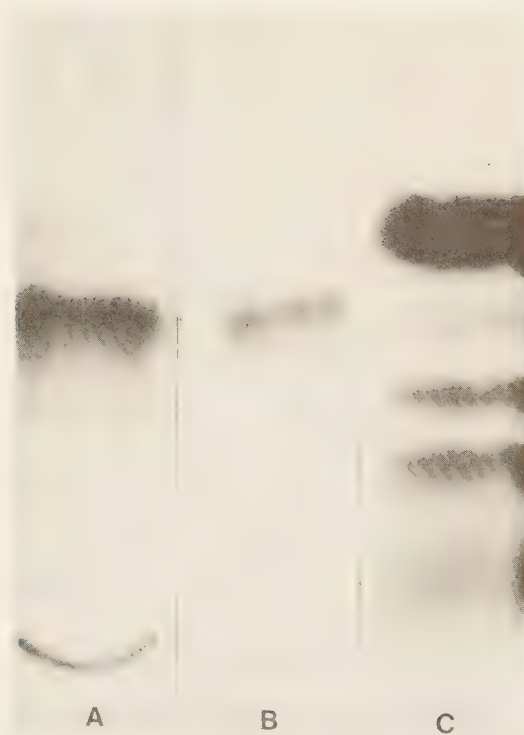


Abb.5: Papierelektrophorese von Amberlite-Fraktion (A), Cellulose-Fraktion (B) und Normalserum (C).

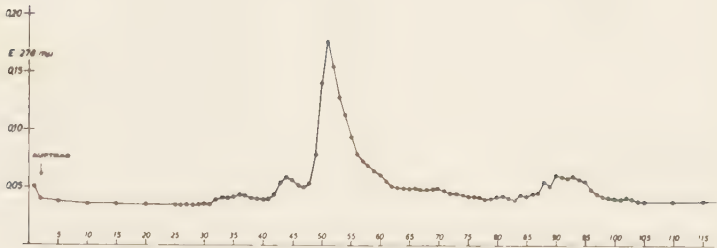


Abb.6: Chromatographie von 30 mg Fraktion  
auf Sephadex G-50 - Säule (2,6 x 95 cm)  
Durchflußgeschwindigkeit 15 ml/Std  
0,2 m Natriumphosphatpuffer,  $p_H$  5,8

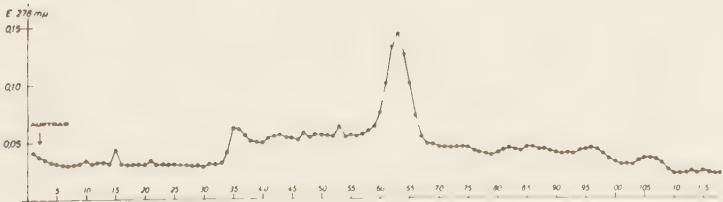


Abb.7: Chromatographie von 450 IE ACTH  
auf Sephadex G-50 - Säule (2,6 x 95 cm)  
Durchflußgeschwindigkeit 15 ml/Std  
0,2 m Natriumphosphatpuffer,  $p_H$  5,8

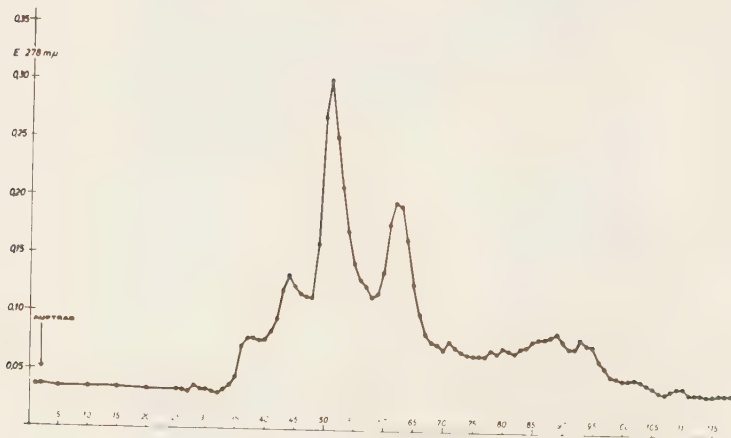


Abb.8: Chromatographie von 30 mg Fraktion + 450 IE  
ACTH auf Sephadex G-50 - Säule (2,6 x 95 cm)  
Durchflußgeschwindigkeit 15 ml/Std  
0,2 m Natriumphosphatpuffer,  $p_H$  5,8

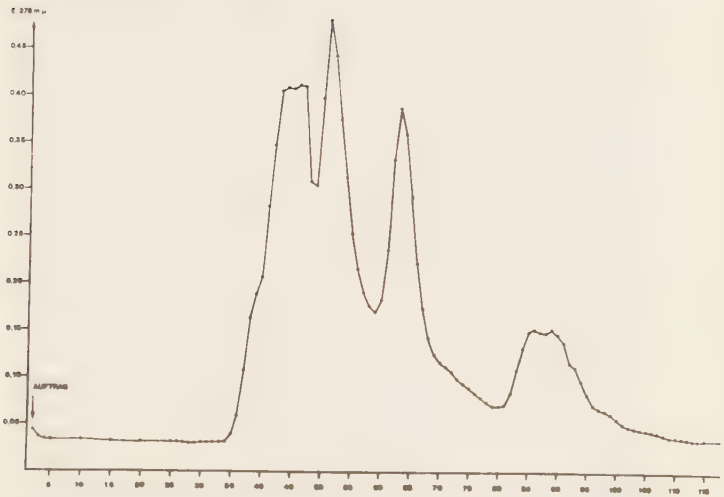


Abb.9: Chromatographie von 125 mg Hypophysenextrakt  
auf Sephadex G-50 - Säule (2,6 x 95 cm)  
Durchflußgeschwindigkeit 15 ml/Std  
0,2 m Natriumphosphatpuffer,  $p_H$  5,8

# LITERATURVERZEICHNIS

1. Anselmino, K.J., Hoffmann, F.: Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens. I. Nachweis, Darstellung und Eigenschaften des Hormons. Klin. Wschr. 10 (1931): 2380
2. Anselmino, K.J., Effkemann, G., Hoffmann, F.: Über die Wirkung des Fettstoffwechselhormons des Hypophysenvorderlappens auf die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren der Leber. Zschr. ges. exper. Med. 96 (1935): 209
3. Anselmino, K.J., Hoffmann, F.: Zur Darstellung des Fettstoffwechselhormons des Hypophysenvorderlappens. Endokrinologie 17 (1936): 1
4. Anselmino, K.J., Hoffmann, F.: Über das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens (Lipotropin) und seine Bedeutung für die Fettumsetzung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Dt. Med. Wschr. 90 (1965): 1697
5. Astwood, E.B., Barrett, R.J., Friesen, H.: Two metabolically active peptides from porcine pituitary glands. Nat. Acad. of Sciences U.S. 47 (1961): 1525
6. Astwood, E.B., Barrett, R.J., Friesen, H.: Two metabolically active peptides from pituitary extract. Sciences 133 (1961): 1364
7. Astwood, E.B.: The pituitary gland and the mobilization of fat. Handbook of Physiology, V. Adipose Tissue. Ed. Renold, A.E., Cahill, G.F. Amer. Physiol. Soc. Washington 1965: 529
8. Barrett, R.J., Friesen, H., Astwood, E.B.: Characterization of pituitary and peptide hormones by electrophoresis in starch gel. J. of Biol. Chem. 237 (1962): 432
9. Beaton, J.R., Szlavko, A.J., Stevenson, J.A.F.: Extraction and chemical characterization of anorexiogenic and fat-mobilizing substances from rat urine. Canad. J. of Physiol. 42 (1964): 647
10. Beaton, J.R., Szlavko, A.J., Borre, A.J., Stevenson, J.A.F.: Diet and temperature effects on excretion of fat-mobilizing substances in rat urine. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 118 (1965): 362

11. Beaton, J.R., Szlavko, A.J., Stevenson, J.A.F.: Observations on the lipolytic action in vitro of a fat-mobilizing substance extracted from urine of fasting rats.  
Canad. J. of Physiol. Pharmacol. 44 (1966): 103
12. Best, C.H., Campbell, J.: Anterior pituitary extracts and liver fat.  
J. of Physiol. (London): 86 (1936): 190
13. Birk, Y., Li, Ch.H.: Isolation and properties of a new, biologically active peptide from sheep pituitary Glands.  
J. of Biol. Chem. 239 (1964): 1048
14. Birk, Y., Li, Ch.H.: An efficient method with high yield for the isolation of adrenocorticotropin from sheep pituitaries.  
Biochem. Biophys. Acta 32 (1964): 429
15. Buckle, R.M.: The stimulating effects of adrenaline and anterior pituitary hormones on the release of free fatty acids from adipose tissue.  
J. of Endocrin. 25 (1962): 189
16. Burns, T.W., Hales, C.N., Stockell Hartree, A.: Observations on the lipolytic activity of human serum and pituitary fractions in vitro.  
J. of Endocrin. 39 (1967): 213
17. Cahill, G.F., Pawan, G.L.S., Chalmers, T.M.: Effects of fat-mobilizing extract from human urine on metabolism of glucose in rat adipose tissue.  
Endocrinology 69 (1961): 648
18. Campbell, J., Lucas, C.C.: The lipid mobilized by anterior pituitary extract.  
Biochem. J. 48 (1951): 241
19. Campbell, J., Martucci, A.D., Green, G.R.: Plasma albumin as an acceptor of free fatty acids.  
Biochem. J. 93 (1964): 183
20. Chalmers, T.M. et al.: On the fat-mobilizing activity of human urine.  
Lancet 1 (1958): 866
21. Chalmers, T.M.: Hormonal nature of urinary fat-mobilizing substance.  
J. Endocrin. 20 (1960): 21
22. Chalmers, T.M. et al.: Fat-mobilizing and ketogenic activity of urine extracts: Relation to corticotropin and growth hormone.  
Lancet 2 (1960): 6

23. Chalmers, T.M.: Fat-mobilizing activity of human urine extracts.  
First Intern. Congr. of Endocrin. Copenhagen 1960
24. Chalmers, T.M.: Lipid-mobilizing activity during fasting.  
Handbook of Physiology, V. Adipose Tissue.  
Ed Renold, A.E., Cahill, G.F.  
Amer. Physiol. Soc. Washington 1965: 549
25. Debons, A.F., Schwartz, I.L.: Dependence of the lipolytic action of epinephrine in vitro upon thyroid hormone.  
J. of Lipid Res. 2 (1961): 86
26. Determann, H.: Separation of substances by chromatography on porous gels.  
Angew. Chem. internat. Edit. 3 (1964): 608
27. Dingemanse, E.: Über die Wirkung von Hypophysenvorderlappenextrakten auf den Azetonkörpergehalt im Blute.  
Endokrinologie 17 (1936): 292
28. Dole, V.P., Meinerts, H.: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissue.  
J. of Biol. Chem. 1235 (1960): 2595
29. Ferguson, K.A., Wallace, A.L.C.: The characterization of pituitary hormones by starch gel electrophoresis.  
Rec. Progr. Horm. Res. 19 (1963): 1
30. Freinkel, N.: Extrathyroidal actions of pituitary thyrotropin: Effects on the carbohydrate, lipid and respiratory metabolism of the rat adipose tissue.  
J. of Clin. Invest. 40 (1961): 476
31. Friesen, H., Irie, M., Barrett, R.J.: An immunologic study of two metabolically active peptides from the anterior pituitary gland.  
J. of exper. Med. 115 (1962): 513
32. Friesen, H., Barrett, R.J., Astwood, E.B.: Metabolic effects of two peptides from the anterior pituitary gland.  
Endocrinology 70 (1962): 579
33. Friesen, H.: Pituitary peptides and mobilization.  
Metabol. 13 (1964): 1214
34. Goodman, H.M., Bray, G.A.: Role of thyroid hormones in lipolysis.  
Amer. J. of Physiol. 210 (1966): 1053

35. Gordon, R.S.: Unesterified fatty acid in human blood plasma. II. The transport function of unesterified fatty acid.  
J. of Clin. Invest. 36 (1957): 810
36. Goth, A., Hegedüs, A.: Fat-mobilizing substance in the urine of patients with diabetes and with pituitary diseases and the effect of insulin on its action.  
Experientia 21 (1965): 277
37. Grassmann, W., Hannig, K.: Ein einfaches Verfahren zur Analyse der Serumproteine und anderer Proteingemische.  
Naturwiss. 37 (1950): 496
38. Greenbaum, A.L., McLean, P.: The mobilization of lipid by anterior pituitary growth hormone.  
Biochem. J. 54 (1953): 407
39. Hagen, J.H.: Effect of glucagon on the metabolism of adipose tissue.  
J. Biol. Chem. 236 (1961): 1023
40. Hirs, C.H.W., Moore, St., Stein, W.H.: A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease.  
J. Biol. Chem. 200 (1953): 493
41. Hirsch, R.L., Rudman, D., Ireland, R., Skraly, R.K.: Movement of free fatty acids into and out of the bloodstream in normal rabbits and in rabbits injected subcutaneously with the pituitary adipokinetic substances fraction H and adrenocorticotropin.  
J. of Lipid Res. 4 (1963): 289
42. Hirsch, R.L., Rudman, D., Travers, R.: Movement of lipids into and out of blood during hyperlipemia induced in rabbits by pituitary extract and fraction H.  
J. of Lipid Res. 7 (1966): 182
43. Hollenberg, C.H., Raben, M.S., Astwood, E.B.: The lipolytic response to corticotropin.  
Endocrinology 68 (1961): 589
44. Iversen, K., Asboehavsen, G.: Studies on the fat-mobilizing factor of the anterior pituitary gland. Suppressive Action of thyroxin.  
Acta Endocrin. 11 (1952): 111
45. Knedel, M., Fateh-Moghadam, A.: Methoden und Ergebnisse der Säulenchromatographie in der klinischen Proteinchemie.  
Ergeb. Lab. Med. 2 (1965): 137

46. Knedel, M., Fateh-Moghadam, A.: Die Gradientenelutionschromatographie.  
G.I.T.(Darmstadt) 9 (1965): 675
47. Landolt, R., Astwood, E.B.: Fat mobilizing and hyperlipemia from pituitary extracts in rabbits.  
Amer.J.of Physiol. 200 (1961): 841
48. Lebowitz, H.E., Engel, F.L.: In vivo and in vitro adipokinetic effects of corticotropin and related peptides.  
Handbook of Physiology, V. Adipose Tissue.  
Ed Renold, A.E., Cahill, J.F.  
Amer.Physiol.Soc Washington 1965: 541
49. Lehnert, G., Mücke, W., Valentin, H.: Untersuchungen über den Einfluß von Somatotropin auf den Fettstoffwechsel.  
Med.Welt (1964): 1720
50. Leites, S.M., Davtjan, N.K.: Permissive role of glucocorticoids in mobilization of fat from adipose tissue.  
Fed.Proc.Transl. Suppl. 25 (1966): T 67
51. Levin, L., Faber, R.K.: Hormonal factors which regulate the metabolism of depot fat to the liver.  
Rec.Progr.Horm.Res. 7 (1952): 399
52. Lewis, U.J., VanderLaan, W.P.: A relationship between thyroid function and naturally occurring inhibitor of hypophyseal proteinases.  
J.of Biol.Chem. 238 (1963): 3336
53. Li, Ch.H., Simpson, M.E., Evenas, H.M.: The influence of the growth and adrenocorticotrophic hormones on the fat content of the liver.  
Arch.Biochem. 23 (1949): 51
54. Li, Ch.H.: Lipotropin, a new active peptide from pituitary glands.  
Nature 201 (1964): 924
55. Li, Ch.H., Barnafi, L., Chretien, M., Chung, D.: Isolation and aminoacid sequence of  $\beta$ -LPH from sheep pituitary glands.  
Nature 208 (1965): 1093
56. Lopez, E., White, J.E., Engel, F.L.: Contrasting requirements for the lipolytic action of corticotropin and epinephrine on adipose tissue in vitro.  
J.of Biol.Chem. 234 (1959): 2254
57. Neufeld, A.H., Scoggan, S.M., Stewart, G.S.: The effect of pituitary preparation on the total body

- glycogen, water, nitrogen and fat of mice.  
Endocrinology 27 (1940): 132
58. Payne, R.W.: Studies on the fat-mobilizing factors of the anterior pituitary gland.  
Endocrinology 45 (1949): 305
  59. Peterson, E.A., Sober, H.A.: Chromatography of proteins. I. Cellulose ion exchange adsorbents.  
J. Amer. chem. Soc. 78 (1956): 751
  60. Raab, W.: Die Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch Hypophysenstoffe.  
Klin. Wschr. 13 (1934): 281
  61. Raben, S., Hollenberg, C.H.: Effect of growth hormone on plasma free fatty acids.  
J. of Clin. Invest. 37 (1958): 922
  62. Renold, A.E., Cahill, G.F.: Adipose Tissue. Section V of the Handbook of Physiology.  
Amer. Physiol. Soc. Washington 1965
  63. Rosenberg, J.N.: Adipokinetic activity of oxycel-purified corticotropin.  
Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 82 (1953): 701
  64. Rudman, D.: Lipemia in the rabbit following injection of pituitary extract.  
Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 99 (1958): 146
  65. Rudman, D., Seidman, F.: Lipemia in the rabbit following the injection of pituitary extract.  
Circulation 18 (1958): 486
  66. Rudman, D.: Further observation on the effect of pituitary gland extracts upon serum lipids of the rabbit.  
Endocrinology 67 (1960): 784
  67. Rudman, D., Seidman, F., Reid, M.B.: Preparation of a lipemia-producing fraction from hog pituitary glands.  
Clin. Invest. 38 (1959): 1038
  68. Rudman, D., Seidman, F., Reid, M.B.: Lipemia-producing activity of pituitary gland: Separation of lipemia-producing component from other pituitary hormones.  
Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 103 (1960): 315
  69. Rudman, D., Reid, M.B., Seidman, F., Di Girolamo, M., Wertheim, F., Bern, S.: Purification and properties of a component of the pituitary gland which produces lipemia in the rabbit.  
Endocrinology 68 (1961): 273

70. Rudman, D., Seidman, F., Brown, St. J., Hirsch, R. L.: Adipokinetic activity of porcine fraction H in the rabbit, guinea pig, rat and mouse. *Endocrinology* 70 (1962): 233
71. Rudman, D.: The adipokinetic action of polypeptide and amino hormones upon adipose tissue of various animal species. *J. of Lipid Res.* 4 (1963): 119
72. Rudman, D., Hirsch, R. L., Kendall, F. E., Seidman, F., Brown, St. J.: An adipokinetic komponent of the pituitary gland: Purification, physical, chemical and biologic Properties. *Rec. Progr. Horm. Res.* 18 (1962): 89
73. Rudman, D., Brown, St. J., Malkin, M. F.: Adipokinetic actions of adrenocorticotropin, Thyroid-stimulating-hormone, vasopressin, alpha- and beta-Melanocyte-stimulating hormones, fraction H, epinephrine and norepinephrine in the rabbit, guinea pig, hamster, rat, hog and dog. *Endocrinology* 72 (1963): 527
74. Rudman, D. et al.: Dose-response curves for the adipokinetic action of aromatic amines and adrenocorticotropin upon the isolated adipose tissue of the hamster. *J. of Lipid Res.* 5 (1964): 28
75. Rudman, D., Malkin, M. F., Brown, St. J., Garcia, L. A., Abell, L. L.: Inactivation of adrenocorticotropin, alpha- and beta-melanocyte-stimulating hormones, vasopressin and pituitary fraction H by adipose tissue. *J. of Lipid Res.* 5 (1964): 38
76. Rudman, D., Di Girolamo, M., Malkin, M. F., Garcia, L. A.: The adipokinetic properties of hypophyseal peptides and catecholamines: A problem in comparative endocrinology. *Handbook of Physiology, V. Adipose Tissue.* Ed Renold, A. E., Cahill, G. F. *Amer. Physiol. Soc. Washington* 1965: 533
77. Rudman, D.: The adipokinetic property of hypophyseal peptides. *Ergebn. Physiol.* 56 (1965): 298
78. Ryszka, F. J., Khokhlov, A. S.: Purification and study of lipotropin from the pituitary glands of various animal species. *Biokhimiya (Moskva)* 30 (1965): 1277

79. Schwandt, P., Knedel, M., Lindlbauer, R.: Untersuchungen zum Verfahren der in vitro Lipolyse.  
Zschr.klin.Chem.u.klin.Biochem. 6 (1968): 81
80. Seifter, J., Baeder, D.H.: Occurrence in plasma of an extractable lipid mobilizer.  
Proc.Soc.exper.Biol.and Med. 91 (1956): 42
81. Seifter, J., Baeder, D.H.: Lipid mobilizer (LM) from posterior pituitary of hogs.  
Proc.Soc.exper.Biol.and Med. 95 (1957): 318
82. Seifter, J., Baeder, D.H.: Lipid mobilization by a crystalline peptide isolated from plasma of horses administered cortisone.  
Proc.Soc.exper.Biol.and Med. 95 (1957): 469
83. Sim, A.W., De Vries, J.W., Vincent, J.E.: Concentration of glycerol and nonesterified fatty acids in plasma during fat mobilization.  
Biochem.J. 92 (1964): 590
84. Sober, H.A., Gutter, F.J., Wyckoff, M.M., Peterson, E.A.: Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum protein on anionexchange cellulose.  
J.Amer.chem.Soc. 78 (1956): 756
85. Stetten, DeW., Salcedo, J.: The source of the extra liver fat in various types of fatty liver.  
J.of Biol.Chem. 156 (1944): 27
86. Szego, C.M., White, A.: The influence of growth hormone on fasting metabolism.  
Endocrinology 44 (1949): 150
87. Tanaka, A. et al.: Relationship of chemical structure to in vitro lipolytic activity of peptides occurring in adrenocorticotropic and melanocyte-stimulating hormones.  
Arch.Biochem.Biophys. 99 (1962): 294
88. Trygstad, O.: A lipid mobilizing peptide prepared from human pituitaries.  
Acta Endocrin.Congr. Suppl. 100 (1965): 144
89. Trygstad, O.: The lipid mobilizing effect of some pituitary gland preparations. I.  
Acta Endocrin. 56 (1967): 626
90. Trygstad, O., Foss, I.: Inhibition by human serum of the adipokinetic effect of a human pituitary lipid-mobilizing factor (LMF) in rabbits.  
Acta Endocrin. 56 (1967): 649
91. Trygstad, O.: The lipid mobilizing effect of some pituitary gland preparations. II.

- Acta Endocrin. 57 (1968): 81
92. Vaughan, M.: Effect of hormones on phosphorylase activity in adipose tissue.  
J. of Biol. Chem. 235 (1960): 3049
  93. Vaughan, M., Steinberg, D.: Effect of hormones on lipolysis and esterification of free fatty acids during incubation of adipose tissue in vitro.  
J. of Lipid Res. 4 (1963): 193
  94. Vaughan, M.: Effect of pitressin on lipolysis and on phosphorylase activity in rat adipose tissue.  
Amer. J. of Physiol. 207 (1964): 1166
  95. Vincent, J.E., de Vries, J.W.: Some effects of a lipid mobilizing preparation of pituitary origin.  
Acta Endocrin. Congr. Suppl. 100 (1965): 142
  96. Weil, R., Stetten, DeW.: The urinary excretion of a fat-mobilizing agent.  
J. of Biol. Chem. 168 (1947): 129
  97. Weil, R., Ross, S.: Growth hormone and fat metabolism.  
Endocrinology 45 (1949): 207
  98. Weil, R.: Pituitary growth hormone and intermediary metabolism.  
Acta Endocrin. Suppl. 98 (1965):
  99. Weinges, K.F., Löffler, G.: Glucagon-empfindliche lipolytische Aktivität im Fettgewebe.  
Klin. Wschr. 43, 3 (1965): 175
  100. Whitaker, J.R.: Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex.  
Anal. Chem. 35 (1963): 1950
  101. White, E., Engel, F.L.: Lipolytic action of corticotropin on rat adipose tissue.  
J. Clin. Invest. 37 (1958): 1556
  102. White, E., Engel, F.L.: Fat mobilizing by purified corticotropin in the Mouse.  
Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 102 (1959): 272
  103. Zarafonitis, Ch. J.D. et al.: Metabolic studies in patients receiving lipid mobilizer hormone.  
Amer. J. of Med. Sciences 234 (1957): 493
  104. Zarafonitis, Ch. J.D. et al.: Effect of prefeeding on the acute response to lipid mobilizer hormone in man.  
Amer. J. of Med. Sciences 235 (1958): 410
  105. Zarafonitis, Ch. J.D. et al.: Current clinical status of lipid mobilizer hormone.

Arch.Intern.Med. 104 (1959): 974

- 106.Zarafonitis,Ch.J.D. et al.: Lipid mobilizer hormone  
in cobalt chloride hyperlipemia.  
J.Amer.Med.Assoc. 191 (1965): 169



Herrn Priv.-Doz.Dr.med. M. K n e d e l danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation; Herrn Prof.Dr.med. H. S c h w i e g k für die Übernahme des Korreferates.

Für die Unterstützung bei Durchführung der Arbeit im Fettstoffwechsel-Labor der I.Medizinischen Universitäts-Klinik möchte ich Herrn Dr.med.P. S c h w a n d t und Mitarbeitern danken.

### Lebenslauf

Am 28.7.1940 wurde ich, Hans-Jürgen Thüner, als Sohn des jetzigen Steuerbevollmächtigten Heinrich Thüner und der früheren technischen Lehrerin Lisa Thüner, geborene Kleybrink, in Lübbecke geboren.

Ostern 1947 wurde ich in die Volksschule Lübbecke eingeschult. Nach 5 Volksschuljahren, ab Ostern 1952, besuchte ich das neusprachliche Gymnasium in Lübbecke, wo ich im Februar 1960 die Reifeprüfung bestand.

Vom 1.4.1960 bis 31.3.1961 leistete ich in Hildesheim den Wehrdienst ab und begann im Sommer-Semester 1961 das Medizin-Studium an der Universität Freiburg/Brsg. Im Sommer-Semester 1962 setzte ich meine Studien wegen der günstigeren Bedingungen in Tübingen fort, absolvierte im Herbst 1962 die naturwissenschaftliche und nach dem Sommer-Semester 1964 die ärztliche Vorprüfung. Im Winter-Semester 1964/65 studierte ich an der Universität Hamburg und im Sommer-Semester 1965 in Wien. Vom Winter-Semester 1965/66 an studierte ich in München, wo ich am 18.12.1967 das Staatsexamen beendete. - In den Semesterferien famulierte ich 3 Monate im Kreiskrankenhaus Lübbecke und 1 Monat in der I.Medizinischen Universitätsklinik München.

Im Januar 1967 heiratete ich die Medizinal-Assistentin Dr.med. Hildburg Thüner, geborene Quidde. Wir haben eine Tochter, Stephanie.

Seit dem 1.3.1968 bin ich an der I.Medizinischen Universitätsklinik in München als Medizinal-Assistent beschäftigt.







